

تهیه کننده: حسین پیری

اصول روشهای کروماتوگرافی (Chromatography)

اصل حاکم بر انواع متفاوت روشهای کروماتوگرافی وجود دو بخش، یکی فاز ثابت و دیگری فاز متحرک در سیستم است. فاز متحرک تقریباً همواره یک سیال بوده و می تواند مایع یا گاز باشد. فاز ثابت نیز می تواند جامد یا مایع باشد. اگر فاز ثابت یک مایع باشد، ممکن است بر روی سطح ذرات جامد توزیع شود و در فرایند جداسازی سهمیم شود. فاز ثابت مایع ممکن است به صورت شیمیایی با ذرات پیوند ایجاد نماید یا بر روی آنها تثبیت شود. به موازات اینکه فاز متحرک نمونه گذشته از فاز ثابت را حمل می کند حل شونده ها با میل ترکیبی کمتر برای فاز ساکن در فاز متحرک باقی می مانند و سریعتر حرکت می کنند و از آنهایی که دارای میل ترکیبی بیشتر هستند جدا می شوند.

روشهای کروماتوگرافی:

اولین روش کروماتوگرافی در سال 1903 توسط تسوت (Tsweet) گیاه شناس روسی گزارش شد. وی از این روش برای جداسازی مواد رنگی استفاده کرد و به همین لحاظ نام کروماتوگرافی را برای آن انتخاب نمود. روشهای کروماتوگرافی بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس فاز ساکن طبقه بندی می شود که در بالا به آن اشاره شد. چنانچه فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را **جذب سطحی** و اگر فاز ساکن مایع باشد کروماتوگرافی را **تقسیمی** می گویند. در کروماتوگرافی جذب سطحی، نمونه بر روی ستون قرار می گیرد و به کمک فاز متحرک بر روی فاز ساکن شروع به حرکت می کند. سرعت حرکت هر جزء در نمونه به میزان جذب سطحی آن بر روی فاز ساکن بستگی دارد. بدیهی است که هر قدر اختلاف جذب سطحی بیشتر باشد جداسازی بهتر صورت می گیرد.

کروماتوگرافی:

1) فاز ثابت جامد

A. فاز متحرک مایع (کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی لایه نازک)

B. فاز متحرک گاز (کروماتوگرافی گاز - جامد)

2) فاز ثابت مایع

A. فاز متحرک مایع (کروماتوگرافی کاغذی و کروماتوگرافی تقسیمی)

B. فاز متحرک گاز (کروماتوگرافی گاز - مایع)

جذب سطحی اجزا بر روی ستون می تواند با برهم کنش های واندروالس و یا الکترواستاتیک انجام شود. در کروماتوگرافی تقسیمی یک جزء متخلخل ساکن به عنوان ماده پر کننده در ستون قرار می گیرد. یک مایع به عنوان فاز ساکن روی ماده پر کننده را می پوشاند و در اصل از آن به عنوان تکیه گاه استفاده می کند.

نمونه بر ستون حاوی فاز ساکن مایع بر روی نگهدارنده جامد قرار می گیرد. فاز متحرک مایع اجزای نمونه را به روی ستون به حرکت در می آورد. بر اساس اختلاف انحلال پذیری اجزاء نمونه در 2 فاز مایع، این اجزاء با سرعتی متفاوت در طول ستون حرکت می کنند و این امر سبب جدا شدن اجزاء مخلوط از یکدیگر می شود. در کروماتوگرافی جذب سطحی، اساس جداسازی اختلاف بین جذب سطحی اجزاء می باشد ولی در کروماتوگرافی تقسیمی اساس جداسازی، اختلاف میان ضرایب تقسیم اجزاء می باشد. در یک مقایسه ساده از روشهای تقسیمی و جذب سطحی باید گفت بطور کلی روشهای تقسیمی برای جداسازی ترکیبات شیمیایی نزدیک به هم، مانند اعضای مشابه یک

خانواده مناسب تر است، ولی روشهای جذب سطحی برای جداسازی انواع مختلف ترکیبات شیمیایی بهتر هستند. مزیت اصلی روشهای تقسیمی این است که نوارهای کروماتوگرافی به علت وجود دنباله نسبتاً باریک و در نتیجه استفاده از ستونها کارآمدتر است.

کروماتوگرافی کاغذی:

در کروماتوگرافی کاغذی، حلال بر طبق خاصیت موینگی خود، همانند فیله در طول ستون کاغذ جاذب (فاز ثابت) پیشروی کرده و اجزای مختلف از نمونه مورد نظر را با سرعتهای مختلف حرکت می دهد.

تحرک اجزای نمونه بر حسب سرعت انتشار، پلاریته و چسبندگی نسبی آنها و همچنین پلاریته حلال صورت می پذیرد. در این روش نمونه مورد نظر را به صورت کانونی خشک شده در سطح کاغذ و قدری بالاتر از سطح محلول قرار می دهند. اجزای نمونه بر حسب تحرک ملکولی و جذب متفاوت آنها در فاز ثابت، پیشروی می کنند و در کانونهای مختلفی نسبت به مبدا تمرکز می یابند که امکان تفکیک و جداسازی آنها را فراهم می سازد. کاغذ مربوطه را پس از خاتمه جداسازی خشک کرده و با افزودن ترکیبات شیمیایی رنگ آمیزی می کنند. ارزیابی کمی کانونهای رنگی از طریق اندازه گیری سطح لکه و شدت رنگ پذیری آن، و در قیاس با مواد استاندارد با حرکت مشابه صورت می گیرد.

شناسایی برخی از ترکیبات، پس از اسپری با معرفهای خاص و واکنش رنگی آنها و یا با استفاده از طیف نور ماوراء بنفش امکان پذیر خواهد بود.

کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography):

کروماتوگرافی لایه نازک که به نامهای مسطح و TLC نیز نامیده می شود، در اساس مشابه کروماتوگرافی کاغذی است. با این تفاوت که بجای کاغذ از ژل پلی آکریلامید یا ژل نشاسته به ضخامت 0/1-0/5 میلی متر که به سطح صفحات شیشه ای یا یک برگه آلومینیمی یا پلاستیکی گسترده شده اند، استفاده می شود. صفحه در یک ظرف یا مخزن درسته حاوی حجم کم از فاز متحرک قرار می گیرد و حلال از طریق لایه نازک و بر اساس ضخامت موینگی که تعادل بین کشش سطحی فاز متحرک و نیروی بازدارنده است، پیشروی کرده و اجزای مختلف از مخلوط را با خود حمل می کند. پس از اینکه فاز متحرک به ارتفاع مطلوب رسید (در عرض 30 تا 90 دقیقه) صفحه را از مخزن برداشته و خشک می کنیم. در این روش با مقادیر کم از نمونه (در حدود 5 µL) نیز قابل اجراست.

اگر صفحه در بعد دوم یا در معرض فاز متحرک متفاوتی قرار گیرد، جداسازی دیگری نیز اتفاق می افتد. پس از اینکه لایه نازک خشک شد اجزاء جدا شده توسط روندهای متفاوتی قابل تعیین محل هستند. لازم به توضیح است که هر گونه خراش، آلودگی و یا رطوبت، ظرفیت الکترواستاتیک صفحه را تقلیل داده و از حساسیت روش می کاهد. برای جلوگیری از تبخیر، از محیطهای سر بسته که توسط بخار اشباع شده اند، استفاده می گردد. میزان حرکت مواد در ستون با مقادیر Rf بیان می شود که عبارت است از نسبت تحرک آنها در مقایسه با مواد حلال و استاندارد روش با استفاده از مواد شناخته شده صورت می گیرد.

لازم به توضیح است که اگر آنالیت مجهول و جزء مرجع Rf یکسان نباشند اجزاء مشابه نخواهد بود. با وجود این، به خاطر اینکه ماده مرجع و ماده مورد نظر دارای مقدار مشابه Rf هستند نمی توان گفت که آنها یکسان و مشابه هستند. به اثبات رسیده است که بیش از یک ماده میتواند دارای مهاجرت مشابه در یک سیستم کروماتوگرافی ویژه باشند.

$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده توسط ماده از مبدا}}{\text{فاصله طی شده توسط حلال از مبدا}} = \frac{\text{(distance moved by compound)}}{\text{(distance moved by solvent)}}$$

در کروماتوگرافی لایه نازک از مواد جاذب نظیر سیلیکا و آلومینا استفاده می کنند. معمولاً جسم جاذب را با مقدار کمی از ماده نگهدارنده‌ای مانند گچ شکسته‌بندی، سولفات کلسیم و یا نشاسته مخلوط می کنند تا جسم جاذب، چسبندگی لازم را پیدا کند و به صفحه مورد نظر بچسبد.

مهمترین مورد استفاده کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در تشخیص کیفی مواد به ویژه در مخلوطهای پیچیده می باشد و به همین دلیل از آن به عنوان وسیله‌ای برای تشخیص داروها و متابولیت‌های آنها در ادرار استفاده فراوان می گردد. یادآوری می گردد که در این روش به علت مزاحمت مواد مختلف موجود در یک مخلوط پیچیده برای یکدیگر ممکن است جوابهای نادرست زیادی عاید گردد و به همین جهت معمولاً این تکنیک را به همراه سایر تکنیکها بکار می برند.

کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (HPTLC):

با پیشرفت تکنولوژی و نیاز به سرعت و دقت بیشتر، روش TLC به صورت روش پیشرفته تری یعنی روش HPTLC ارائه گردیده است. قدرت تفکیک صفحات HPTLC خیلی بیشتر از صفحات TLC است. در این روش ذرات سیلیکا ژل مورد استفاده خیلی ریزتر (2 تا 7 میکرومتر) از TLC است و همین مساله موجب تکرارپذیری بیشتر و امکان تعیین مقدار دقیق تر شده است. تنها اشکال HPTLC این است که مقدار ماده جداشده در این روش کم است و نمی توان برای ماده جداشده روشهای شناسایی دیگری انجام داد.

کروماتوگرافی ستونی (Column Chromatography):

کروماتوگرافی ستونی یکی از روشهای بسیار مفید برای جداکردن مخلوط مواد از یکدیگر می باشد. برخلاف TLC که مقدار نمونه مورد استفاده کم می باشد، در کروماتوگرافی ستونی عمل تفکیک مواد می تواند بر روی مقدار زیادی از نمونه انجام گیرد. ستونهای کروماتوگرافی معمولاً از جنس شیشه ساخته شده و به منظور حصول نتایج بهتر طول آن تا حدودی طویل انتخاب می گردد. از ستونهای دیگر که کواثرتر و عرض زیادتری دارند به منظور جداسازی مقادیر زیادی از ترکیبات جداسازی استفاده می گردد. در داخل این ستونها رزین‌هایی مانند دکستران، آگارز یا سفادکس را پس از شستشو و آماده سازی می ریزند، بطوریکه هیچگونه حباب هوا نداشته باشد. لازم به توضیح است که ستونها را باید تا سطح یک سوم آن از رزین پر کرد. هر بار که رزین در داخل ستون ریخته می شود باید مدتی صبر کرد تا ژل در داخل ستون کاملاً رسوب کند و دوباره عمل ریختن رزین در داخل ستون را انجام داد. این عمل را می توان با استفاده از یک میله شیشه‌ای انجام داد تا هیچگونه حبابی در داخل ستون قرار نگیرد. در این روش برای اضافه کردن نمونه به ستون، ابتدا نمونه را (حدود یک گرم) در یک حلال مناسب حل می کنند و به صورت لایه‌ای نازک در بالای ستونی که از رزین پر شده و آماده استفاده است قرار می دهند. سپس با اضافه کردن حلال مناسب، ترکیبات موجود در این مخلوط نمونه با سرعت‌های متفاوتی به طرف پایین حرکت می کنند و به تدریج از طرف دیگر ستون همراه حلال خارج می شوند.

در کروماتوگرافی ستونی، ترکیباتی که اندازه بزرگتر و وزن ملکولی بیشتری دارند زودتر از ستون خارج می شوند تا ذراتی که کوچکتر هستند و وزن ملکولی کمتری دارند. رزین‌هایی که نام برده شدند هیچگونه واکنش شیمیایی با اجزاء مخلوط مورد مطالعه ندارند. اگر رزین دارای گروههای شیمیایی با بار مثبت باشد، اجزایی از مخلوط را که دارای بار منفی است جذب می کند و اگر رزین دارای بار منفی باشد اجزایی از مخلوط را که دارای بار مثبت است جذب می کند که به ترتیب رزین را **تعویض کننده منفی** و **تعویض - کننده مثبت** می گویند. در این نوع جداسازی دو نوع بافر از بالای ستون اضافه می شود؛ بافر اول، در این مرحله اجزایی (ترکیباتی) که بار الکتریکی مخالف با بار رزین دارند را جذب می کند و بقیه از ستون خارج می شوند. در مرحله دوم که دومین بافر اضافه می شود قدرت یونی، این بار به تدریج اضافه می شود لذا ترکیبات مختلف که با قدرت مختلفی به رزین متصل هستند به تدریج از ستون خارج می شوند. قسمتهای حلال خارج شده از انتهای ستون را که حاوی مواد مختلف موجود در نمونه است به طور جداگانه بررسی می کنند و پس از حذف

حلال اضافی مواد باقی مانده را شناسایی و تعیین مقدار می کنند. حلال های مورد استفاده در این روش معمولاً هپتان، اتر، بنزن و ... می باشد. انتخاب رزین داخل ستون و حلال بستگی به نوع مواد موجود در نمونه دارد.

ژل کروماتوگرافی (Gel Chromatography) :

ژل کروماتوگرافی روش ساده ای برای جداسازی ماکروملکولها است. ژل ماده ایست که حاوی روزنه هایی با ابعاد مشخص می باشد. وقتی که ملکولهایی با ابعاد مختلف به بالای ستون حاوی ژل اضافه می شوند ملکولهای درشت به داخل روزنه ها وارد نمی شوند، بنابراین توسط محلول شستشو دهنده (Elution) سریعتر از ستون عبور می کنند در حالیکه ملکولهای ریز به داخل روزنه ها وارد شده و دیرتر از ستون خارج می شوند.

تعداد زیادی از مواد برای پر کردن ستون ژل کروماتوگرافی مورد استفاده قرار می گیرند. این مواد ممکن است نرم، نیمه سخت و یا سخت باشند. به هر حال این مواد باید از نظر مکانیکی بسیار پایدار، دارای روزنه هایی با ابعاد یکسان باشند، از جمله موادی که استفاده می - شوند می توان از سفادکس، بیوژل و سفارز نام برد.

فاکتورهای مؤثر بر روی جداسازی مواد در ژل کروماتوگرافی :

انتخاب نوع ژل برای جداسازی مخلوط ترکیبات مختلف نقش اساسی دارد. همچنین روزنه های ژل نیز با توجه به نوع ماده ای که لازم است جدا شوند، انتخاب می شوند. در جدول زیر اندازه های روزنه های ژل آورده شده است.

طول ستون و قطر ستون نیز در جداسازی مواد مؤثر است. قطر نمونه باید براساس اندازه نمونه ها انتخاب شود. حجم نمونه به مشخصات و نوع نمونه بستگی دارد. معمولاً حجم نمونه 1 تا 5 درصد کل حجم ظاهری است. سرعت جریان بافر از ستون نیز فاکتور دیگری است که بر جداسازی مواد در ستون تاثیر می گذارد. حداکثر جداسازی معمولاً با ستون بلند و سرعت جریان کم بدست می آید، در حالیکه سریعترین جداسازی با ستونهای کوتاه و سرعت جریان بالا بدست می آید.

کروماتوگرافی تعویض یونی (Ion exchange chromatography) :

کروماتوگرافی تعویض یونی یک روش بسیار مناسب برای جداسازی ترکیبات باردار مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئینها و اسیدهای آمینه است. در کروماتوگرافی تعویض یونی ملکولهای باردار بر روی سطح محیط پایه جامد بطور قابل برگشت جذب می شوند. جداسازی توسط تعویض یون شامل دو مرحله است؛ در مرحله اول مواد بر روی یون تعویض کننده متصل می شوند. سپس این مواد توسط بافر با pH و قدرت مختلف جدا می شوند، بطوریکه بافر اتصال به ماده یون تعویض کننده رقابت می کند. بطور کلی کروماتوگرافی تعویض یون براساس نحوه کار به دو دسته اصلی تقسیم می شوند:

1. تعویض کننده کاتیونی
2. تعویض کننده آنیونی

تعویض کاتیونی: گروه عملی ثابت در این مورد حاوی بار منفی است. برای مثال؛ سلولز -CM، سفادکس -SP

تعویض آنیونی: گروه عملی ثابت در این مورد حاوی بار مثبت است. برای مثال؛ سلولز -EAE، سلولز -PAB، سفادکس -DEAE

انتخاب شرایط کروماتوگرافی تعویض یونی:

1) انتخاب نوع تعویض یون:

انتخاب نوع تعویض یون به نوع ماده‌ای که باید جداسازی شود بستگی دارد. بسیاری از ترکیبات بیولوژیک در pH خاص فعالیت دارند، لذا در انتخاب نوع تعویض یون محدودیتهایی وجود دارد. در صورتی که ترکیبی در زیر pI، پایدار باشد یک تعویض کاتیونی مناسب‌تر است در صورتی که ترکیبی در بالای pI، پایدار باشد یک تعویض آنیونی مناسب‌تر است.

2) انتخاب نوع بافر:

در صورتی که یونهای بافر مخالف بار تعویض را داشته باشند در مراحل جداسازی شرکت می‌کنند. بنابراین بافر کاتیونی در تعویض یون آنیونی و بافر آنیونی در تعویض یون کاتیونی ترجیح داده می‌شود. بافرهایی که برای تعویض یونی مورد استفاده قرار می‌گیرند از قدرت بافری بالا و قدرت یونی پایین برخوردارند.

3) انتخاب pH:

pH بافر به نوع ماده‌ای که باید جدا شود، بستگی دارد. در تعویض آنیونی pH باید یک واحد بالاتر از pI و در تعویض کاتیونی باید یک واحد پایین‌تر از pI باشد.

4) قدرت یونی:

قدرت یونی بافر شروع باید پایین‌تر از قدرت یونی ترکیباتی باشد که به محیط پایه متصل می‌شود. درحالی‌که بافر انتهایی باید قدرت بالایی داشته باشد که جایگزین ماده‌ای که باید جدا شود، گردد.

5) غلظت نمونه:

مقدار نمونه‌ای که توسط ستون جدا می‌شود به ظرفیت ستون بستگی دارد.

گاز کروماتوگرافی (Gas chromatography):

گاز کروماتوگرافی (GC) فرایندی است که توسط آن مخلوطی با وارد کردن نیرو بر حالت گازی آن به اجزاء سازنده‌اش جدا می‌شود و فاز متحرک (گاز حامل) از میان یک ستون حاوی ذرات فاز ساکن عبور می‌کند. جداسازی حل‌شونده‌ها در مخلوط بر مبنای تفاوت‌های نسبی در فشار بخار آنها و برهم‌کنش‌شان با فاز ساکن می‌باشد. یک جزء با فشار بخار بالا سریعتر از ذراتی که فشار بخار پایین‌تر دارند شسته می‌شود. اگر یک جزء به صورت انتخابی با فاز ساکن واکنش نشان دهد بازداشته خواهد شد و بعد از ماده‌ای که دارای برهم‌کنش کمتری است شسته خواهد شد. سیال خروجی که حاوی اجزای نمونه جدا شده است به آشکارساز (دکتور) می‌رود. آشکارساز سیگنالی تولید می‌کند که به صورت یک سری پیک نشان داده می‌شود. حجم و زمانی که در آن، یک حل‌شونده از یک ستون شسته می‌شود را برای شناسایی ماده مجهول استفاده می‌کنند. ظهور یک پیک در زمان بازداری مورد انتظار ثابت نمی‌کند که حتماً جسم مورد نظر وجود دارد، بلکه داده‌ها تا حدی مطابق با ظهور آن ماده می‌باشد. اندازه پیک (مساحت یا ارتفاع) متناسب با مقدار ماده آشکار شده است و می‌تواند برای توصیف مقدار آنالیت در نمونه به کار برده شود.